

白文凤,黄强.植物成分对蜂螨繁殖影响研究[J].江西农业大学学报,2023,45(6):1496-1503.

BAI W F, HUANG Q. Study on effect of phytochemical on *Varroa destructor* reproduction[J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2023, 45(6):1496–1503.

植物成分对蜂螨繁殖影响研究

白文凤1,2,黄 强1,2*

(1.江西农业大学 蜜蜂研究所,江西 南昌 330045;2.江西农业大学 动物科学技术学院,江西 南昌 330045)

摘要:【目的】狄斯瓦螨(Varroa destructor)感染是导致西方蜜蜂(Apis mellifera)蜂群死亡的主要因素。研究旨在筛选出安全高效的植物成分杀螨剂,为研发绿色杀螨剂提供依据。【方法】以西方蜜蜂为试验材料,检测筛选原儿茶酸、青蒿素、芹菜汁饲喂,芹菜籽熏蒸对狄斯瓦螨及其感染的西方蜜蜂死亡率、免疫与残翅病毒(DWV)基因表达水平;运用代谢组学鉴定分析狄斯瓦螨死亡的代谢通路,进一步探究芹菜籽中3个主要挥发性成分对狄斯瓦螨的抑制作用。【结果】原儿茶酸、青蒿素和芹菜汁在饲喂出房蜂的情况下杀螨效果不显著(P>0.05)。但在熏蒸试验中,使用芹菜籽和芹菜籽主成分均有较好的杀螨效果。芹菜籽熏蒸的试验结果显示瓦螨死亡率高达80%,显著高于对照组(P<0.05),蜜蜂存活率与对照组无显著差异(P>0.05),使用芹菜籽处理蜜蜂24h后,其体内的免疫基因 abaecin、pqrpsc2505 和残翅病毒(DWV)基因表达量相较于对照组显著降低。在芹菜籽3种主效挥发物质香芹酚、邻伞花烃和萜品烯中,气味浓郁的香芹酚表现出最强的杀螨效果,但对蜜蜂存活率表现出负面影响,试验组与对照组蜜蜂死亡率差异不显著(P>0.05)。【结论】芹菜籽熏蒸具有较好的杀螨作用,其3种主效挥发物质香芹酚、邻伞花烃和萜品烯都可作为杀螨剂的候选成分。

关键词:狄斯瓦螨:西方蜜蜂:植物提取物:杀螨剂

中图分类号:S895.3⁺2 文献标志码:A

文章编号:1000-2286(2023)06-1496-08

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Study on Effect of Phytochemical on *Varroa destructor*Reproduction

BAI Wenfeng^{1,2}, HUANG Qiang^{1,2*}

(1.Institute of Honeybee, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China; 2.College of Animal Science and Technology, Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045, China)

Abstract: [Objective] Varroa destructor is the main stressor driving the honey bee colony failure in Apis mellifera. This study aims to select an effective plant product medicine, thus providing the theoretical support for environment–friendly miticide development. [Method] After infestation, the bees were fed with protocatechnic acid, artemisinin, and celery juice. Additionally, we treat the infested bees with celery seed in order to quantify

收稿日期:2023-09-25 修回日期:2023-10-16

基金项目:江西省重点研发项目(20202BBFL63028)和江西省"双千计划"项目(JXSQ2020101078)

Project supported by the Science and Technology Program Project of Jiangxi Province (20202BBFL63028) and the "Double Talent" project of Jiangxi Province (JXSQ2020101078)

作者简介:白文凤,硕士生,orcid.org/0000-0001-8490-8582,dabaiwf@163.com;*通信作者:黄强,副教授,博士,orcid.org/0000-0001-5528-5099,qiang-huang@live.com。

mite survival, bee survival, virus load and bee immune responses. The metabolic pathway leading to mite death was identified by metabolomics analysis. Additionally, the miticide efficiency of the three main volatile components of the celery seed was tested. [Result] The impact of protocatechuic acid, artemisinin, and celery juice on mite mortality was minor compared with the control group (P>0.05). Celery seeds effectively inhibited mite survival (P<0.05) and virus proliferation (P<0.05), with a minor impact on bee survival (P>0.05). The main volatile components of celery seed, carvacrol, alkanes, and terpinene all effectively inhibited mite survival. [Conclusion] Celery seeds showed strong mite inhibitory effects, and the three main volatiles, Carvacrol, ocymene and terpenes, can be used as candidate components of acaricides.

Keywords: Varroa destructor; Apis mellifera; plant compound; miticide

【研究意义】授粉是维持生态系统平衡的中心支柱,全球85%的植物和35%的农作物依靠昆虫授粉, 蜜蜂则是应用最为广泛的授粉昆虫11。在欧盟,蜜蜂授粉产值达142亿欧元/年,美国150亿美元/年,我 国为3042亿人民币/年,相当于全国农林牧渔总产值的6.18%[2]。自2006年美国和欧洲相继爆发大规 模蜜蜂群体死亡以后,引起了人们对农业减产和生物多样性丧失的严重担忧。欧洲和美国已经启动 一系列针对可持续授粉和蜜蜂健康方面的研究,美国更是将"保护好蜜蜂"列入国家战略任务。虽然 有越来越多的报道表明,气候变化、栖息地丧失、杀虫剂、寄生虫和病毒对蜜蜂健康有显著影响,但是 导致西方蜜蜂死亡的主要因素为狄斯瓦螨(Varroa destructor)[3]。【前人研究进展】狄斯瓦螨(V. destructor) 为蜜蜂体表寄生虫,以吸食蜜蜂肥大细胞和淋巴液为食,危害蜜蜂幼虫、蛹和成虫草。狄斯瓦螨的寄生 可分为自由寄生和繁殖两个阶段[5]。在自由寄生阶段,狄斯瓦螨寄生于幼虫或成年蜜蜂的胸部和腹 部,通过蜂群内的哺育行为或蜂箱外的采集行为,迅速在蜜蜂个体以及蜂群之间传播。在繁殖阶段, 雌性瓦螨会在大幼虫封盖之前爬入蜂房,在蜂房封盖后,先产1枚雄性卵,然后再产7~9枚雌性卵,雄 性后代和雌性后代在封盖房内交配,交配之后的雌性瓦螨随后离开巢房,开始新一轮感染(6)。狄斯瓦 螨的另一种危害来源于其所携带的蜜蜂残翅病病毒(deformed wing virus, DWV)。狄斯瓦螨在吸食蜜 蜂淋巴液的同时,会将残翅病毒(DWV)注射到蜜蜂体内,致使蜜蜂发育畸形,免疫力下降,无法越冬,从 而导致蜜蜂蜂群瓦解[7]。在现在的养蜂生产中,化学除螨剂是目前控制蜂螨数量的主要方法,主要包括 氟胺氰菊酯、氟氯苯氰菊酯、蝇毒磷和双甲脒18。频繁使用化学杀虫剂,虽然在短期内达到了出色的效 果,但是长期大量使用杀螨剂使得狄斯瓦螨抗药性的问题越来越严重,甚至产生了国内外蜂产品的药物 残留和化学试剂污染的问题[9-11],这对于我国绿色养蜂和授粉的长期发展是非常不利的[12]。植物提取物 通常是将破碎的植物组织经过水蒸气长时间蒸馏获得,接近天然成分。历年研究已证实多种植物提取 物对螨类有明显的抑制作用[13-14]。

【本研究切入点】颜伟玉等[15]研究证明,芹菜提取物具有抑制狄斯瓦螨的作用,而芹菜干燥粉和芹菜干燥粉溶液抑制效果均不明显,在芹菜汁的处理下,蜜蜂脱螨率明显,且死亡率不高。在试验试剂保存方面发现芹菜籽的粉剂同芹菜汁具有相同的效果,并且相对于芹菜籽粉末来讲,新鲜的芹菜汁更难获取和保存。此外芹菜籽作为一种药食同源的中药,主要被用来治疗腹水、肾脏疾病等,在抗炎方面疗效显著[16]。现有的消炎类药物在一定程度上存在胃肠道的不良反应等[17]。在芹菜籽的显著治疗效果下,笔者对其作用蜜蜂应答机制做出假设,并探讨芹菜籽熏杀过程中主要起作用的物质成分。【拟解决的关键问题】研究拟探索芹菜籽挥发性物质对狄斯瓦螨的抑制作用,以及对蜜蜂的毒害、免疫力和代谢组的影响,以筛选其是否能成为杀螨剂的候选成分。

1 材料与方法

1.1 试验蜜蜂与狄斯瓦螨

西方蜜蜂(Apis mellifera)由江西农业大学蜜蜂研究所蜂场提供,分为健康蜂群和重螨蜂群。健康蜂群定期在每年的4月、6月和10月份使用甲酸和螨扑杀螨1个周期(21 d左右),在夏季和冬季会关王21 d

断子除螨,定期检测健康蜂群染螨状态。重螨蜂群试验期内不使用杀螨剂,不治螨,定期补子脾维持蜂群。狄斯瓦螨来源于重螨蜂群,从蜂群中选择出房蜂,用细小的毛刷将出房蜂上的狄斯瓦螨刷下,并收集在培养皿中,收集的狄斯瓦螨用5d的大幼虫饲养,通过比对蜂群中常规蜂蛹染螨情况,每个培养皿(直径9cm)中培养不超过20只大幼虫,每只大幼虫寄生不超过5只狄斯瓦螨,待后续试验(图1)。移螨需要在短时间内完成,以保持狄斯瓦螨活性。



图1 狄斯瓦螨的形态

Fig.1 Morphology of the Varroa destructor

1.2 试验方法

1.2.1 饲喂原儿茶酸、青蒿素和芹菜汁对西方蜜蜂和狄斯瓦螨死亡率的影响 将5g原儿茶酸(北京索莱宝科技有限公司)溶于食用乙醇,稀释至2.5×10⁴g/mL;将5 mg青蒿素(北京索莱宝科技有限公司)溶于丙酮(北京索莱宝科技有限公司),稀释至10³ mg/L;试验过程中每天从江西农业大学菜市场购入的新鲜芹菜茎、叶磨碎,过滤得到新鲜芹菜汁。试验提前24h从健康蜂群中抽取封盖子,将其移至培养箱,取24h内出房的蜜蜂为同一批试验蜜蜂,30只蜜蜂为1组,每只蜜蜂体表接种1只狄斯瓦螨,放至带孔的杯子中,将50%糖水和植物提取物按1:10的比例混合,让蜜蜂自由采食,每天更换新鲜食物。试验设置3个生物学重复,每天记录狄斯瓦螨死亡率和蜜蜂死亡率并及时清理死亡蜜蜂,另外设置2个对照组,在糖水中分别添加相同比例的丙酮和食用乙醇,用以消除溶剂对蜜蜂的影响。

1.2.2 熏蒸芹菜籽对西方蜜蜂和狄斯瓦螨死亡率的影响 取健康蜂群(n=3)的新出房蜂,每只蜜蜂上接种1只瓦螨,20个蜜蜂为1组,蜜蜂和螨都移入试验装置杯中,杯内放置50%蔗糖溶液,让蜜蜂自由采食,在培养皿中加入磨碎的芹菜籽,使其自由挥发,在室温下熏蒸24h,并记录试验组(芹菜籽熏蒸)和对照组(蒸馏水熏蒸)的蜜蜂和狄斯瓦螨的死亡数量,试验收集芹菜籽熏蒸处理组和对照组的蜜蜂,将其快速置于液氮中保存后续取蜜蜂腹部进行非靶标代谢组检测,每组6个重复。

1.2.3 芹菜籽3种主要成分熏蒸对西方蜜蜂和狄斯瓦螨死亡率的影响 芹菜籽的挥发成分中,γ-萜品烯(萜品烯)、1-甲基-2-异丙基苯(邻伞花烃)、2-甲基-5-异丙基苯酚(香芹酚)的含量较高[10]。购买标准品后(北京索莱宝科技有限公司),使用99.9%食用乙醇将萜品烯、邻伞花烃和香芹酚溶解后稀释至1%备用。试验取健康蜂群(N=3)的新出房蜂,每只蜜蜂上接种1只狄斯瓦螨,蜜蜂和螨都移入试验装置杯中,杯内放置50%蔗糖溶液,让蜜蜂自由采食,在培养皿中加入α(1%萜品烯)、b(1%邻伞花烃)、c(1%香芹酚)、d(乙醇)、e(1%萜品烯:1%邻伞花烃:1%香芹酚精油=1:1:1混合物)和f(水)组各40只蜂,熏蒸1h,观察24h蜜蜂的存活情况,分别在10,20,30,60 min和24h记录蜜蜂死亡数和狄斯瓦螨脱落率。

1.3 代谢组检测

试验中非靶向代谢组学交由北京诺禾致源科技股份有限公司完成。非靶向代谢组项目基于液质联

用(LC-MS)技术,代谢物定性定量分析使用mzCloud、mzVault和MassList数据库作为背景处理[18-20]。

1.4 RNA提取、cDNA合成和qPCR扩增

西方蜜蜂的总 RNA用 Trizol 总 RNA 提取试剂盒(北京全式金生物技术有限公司)在4 °C下提取。每个RNA样本取2 μ L,用 TAKARA 反转录试剂盒(宝生物工程有限公司)进行逆转录,合成 cDNA。通过 qPCR 分析确定西方蜜蜂免疫和残翅病毒基因相对表达量。10 μ L qPCR 反应均使用 TB Green **Premix Ex Taq** II、正向和反向引物(各 0.4 μ L)、2 μ L ddH₂O 和 2 μ L cDNA。反应在实时 PCR 检测系统上进行,循环条件如下:40 个 PCR 循环(95 °C,10 min;95 °C 15 s;57 ~ 60 °C 1 min),每个反应重复 3 次,Beta-Actin 为内参基因。

1.5 数据分析

用R软件进行统计分析,对照组和处理组中蜜蜂和狄斯瓦螨死亡数量用t检验分析,并用FDR法矫正多重比较,基因相对表达量用ANOVA分析。

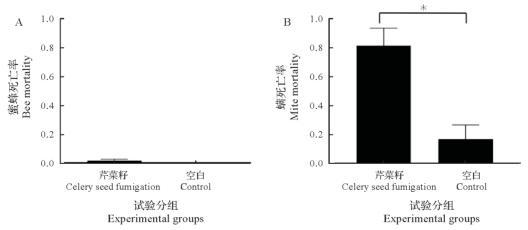
2 结果与分析

2.1 芹菜籽对狄斯瓦螨存活率、西方蜜蜂存活率和蜜蜂免疫基因表达的影响

用原儿茶酸、青蒿素和芹菜汁饲喂被感染的蜜蜂后,瓦螨死亡率与对照组差异不显著(P>0.05)(表1)。加入芹菜籽之后瓦螨的死亡率显著高于对照组(P<0.05),但对蜜蜂存活率无显著影响(P>0.05),说明芹菜籽具有较好抑制瓦螨的作用(图2)。芹菜籽处理24 h后,与对照组相比,蜜蜂体内残翅病毒(DWV)含量显著下降,但卵黄原蛋白基因(Vg)和抗菌肽基因(Abaecin)相对表达量均显著低于对照组幼虫(P<0.05),其余免疫基因表达无显著差异(图3)。

表 1 饲喂植物提取物对狄斯瓦螨和西方蜜蜂死亡率的影响 Tab.1 Shedding of the mites and bee mortality after feeding plant extracts

	•		
项目 Item	蜂螨死亡率 Mortality of mites	蜜蜂死亡率 Mortality of bees	
正常 Normal	0.31±0.22	0.09±0.09	
青蒿素 Artemisinin	0.28±0.22	0.10±0.13	
丙酮 Acetone	0.37±0.24	0.15±0.18	
原儿茶酸 Protocatechuic acid	0.42±0.26	0.16±0.13	
酒精 Ethanol	0.31±0.21	0.12±0.08	
水 Water	0.49 ± 0.30	0.12±0.10	
芹菜 Celery	0.21±0.16	0.05±0.05	

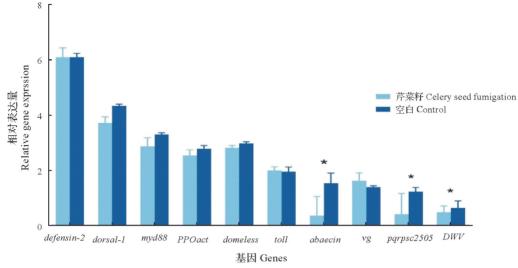


A:蜜蜂死亡率;B:狄斯瓦螨死亡率;误差线表示±标准差,*表示差异在P<0.05水平上极显著。

A: bee mortality; B: mite mortality; Error bar indicates standard variance, * indicates variation is significant at P<0.05 level.

图 2 熏蒸芹菜籽对蜜蜂与狄斯瓦螨死亡率的影响

Fig.2 Mortality of bees and mites after the treatment of celery seed fumigation



误差线表示±标准差,*表示差异在P<0.05水平上极显著。

Error bar indicates standard variance, * indicates variation is significant at P < 0.05 level.

图 3 芹菜籽熏蒸前后蜜蜂免疫和残翅病毒基因相对表达量差异

Fig. 3 Relative expression levels of immunogene and DWV gene of celery seed fumigation on honey bee

2.2 芹菜籽熏蒸对西方蜜蜂代谢组的影响

结果显示,负离子模式下,芹菜籽熏蒸处理组(n=6)和对照组(n=6)的蜜蜂样品采用LC-MS技术共

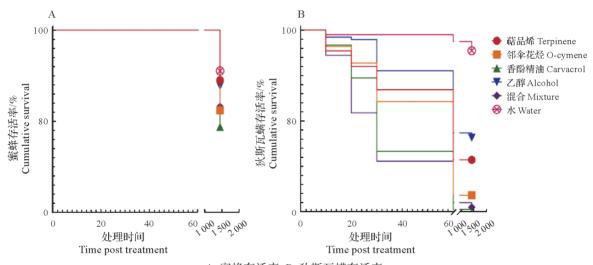
表 2 熏蒸芹菜籽对西方蜜蜂差异极显著的主要代谢产物和通路 Tab.2 The main metabolites with significant variance and the associated pathway of celery seed fumigation on honey bee

代谢物名称(上调) Metabolites(up)	Kegg 通路 Kegg pathway	代谢物名称(下调) Metabolites(down)	Kegg 通路 Kegg pathway
甲基丙二酸 Methylmalonic acid	C02170	柚皮素 Naringenin	C00509
腺苷酸基琥珀酸 Adenylsuccinic acid	C03794	芸香苷 Rutin	C05625
尿酸 Uric acid	C00366	前列腺素 B2 Prostaglandin B2	C05954
膦酸盐 dIMP	C06196	白杨素 Chrysin	C10028
脱氧尿嘧啶核苷酸甲基化 dUMP	C00365	叶酸 Folic acid	C00504
胸腺嘧啶脱氧核苷酸 5-Thymidylic acid	C00364	脱氧胞苷 Deoxycytidine	C00881
二十二酸 Behenic acid	C08281	染料木素 Genistein	C06563
辛二酸 Suberic acid	C08278	癸二酸 Sebacic acid	C08277
谷胱甘肽 Glutathione	C00051	1.D-葡糖胺-6-磷酸 Glucosamine 6-phosphate	C00352
半胱氨酸 L-Cysteine	C00097	氢过氧化物的外消旋混合物 13-L-Hydroperoxylinoleic acid	C04717
正缬氨酸 Norvaline	C01799	苯甲酰甲酸 Phenylglyoxylic acid	C02137
胞磷胆碱 Citicoline	C00307	十五烷酸 Pentadecanoic acid	C16537
肌苷酸 Inosinic acid	C00130	7-甲基黄嘌呤 7-Methylxanthine	C16353
次黄嘌呤核苷 Inosine	C00294	20-羟-二十烷四烯酸 20-Hydroxyeicosatetraenoic acid	C14748
1-萘酚 1-Naphthol	C11714	异鼠李素 Isorhamnetin	C10084
罂粟碱 Papaverine	C06533	二十二碳六烯酸 Docosahexaenoic acid	C06429
葡糖苷酸睾酮 Testosterone glucuronide	C11134	齐墩果酸 Oleanolic acid	C17148
3,4-二羟基苯基 3,4-Dihydroxyhydrocinnamic acid	C10447	桑色素 Morin	C10105
香豆素 Coumarin	C05851	黄曲霉毒素 G2 Aflatoxin G2	C16754
D-半胱氨酸 D-Cysteine	C00793	十六酰胺乙醇 Palmitoylethanolamide	C16512
3-甲氧酪胺 3-Methoxytyramine	C05587	美洛西林 Mezlocillin	C07221
		雌二醇 Estradiol	C00951
		9-OxoODE	C14766
		N-乙酰神经氨糖酸 N-Acetylneuraminic acid	C19910
		5-KETE	C14732
		D-半乳糖胺 D-Galactosamine	C02262
		氢醌 Hydroquinone	C00530
		丁胺卡那霉素 Amikacin	C06820

鉴定有392个代谢物。在有芹菜籽熏蒸和无芹菜籽熏蒸下,两组蜜蜂中所鉴定的代谢物存在差异。相比于对照组,芹菜籽熏蒸组共有54种差异表达代谢物,共有36种鉴定代谢物。其中有17种鉴定代谢物上调,有19种鉴定代谢物下调。将鉴定差异代谢物通过KEGG进行富集分析,以确定代谢通路,结果显示,负离子模式下,在芹菜籽熏蒸作用下,蜜蜂体内上调的17种鉴定代谢物富集到37个代谢通路中,下调的19种代谢物富集到29个代谢通路中。正离子模式下,芹菜籽熏蒸处理组(N=6)和对照组(N=6)的蜜蜂样品采用LC-MS技术共鉴定有628个代谢物。在有芹菜籽熏蒸和无芹菜籽熏蒸下,两组蜜蜂中所鉴定的代谢物存在差异。相比于对照组,芹菜籽熏杀组共有84种差异表达代谢物,共有36种鉴定代谢物。其中有16种鉴定代谢物上调,有20种鉴定代谢物下调。将鉴定差异代谢物通过KEGG进行富集分析,以确定代谢通路,结果显示,正离子模式下,在芹菜籽熏蒸作用下,蜜蜂体内上调的16种鉴定代谢物富集到25个代谢通路中,下调的20种代谢物富集到29代谢通路中(表2)。

2.3 芹菜籽主要挥发成分对西方蜜蜂和狄斯瓦螨的存活率影响

与对照组相比,3种芹菜籽主要挥发成分均表现出显著的杀螨效果,杀螨率从高到低依次为香芹酚、3种混合挥发成分、邻伞花烃、萜品烯。3种芹菜籽主要挥发成分对西方蜜蜂存活率无显著影响(图4)。



A:蜜蜂存活率;B:狄斯瓦螨存活率。

A: cumulative survival of bees; B: cumulative survival of mites.

图 4 芹菜籽主要挥发成分对西方蜜蜂与狄斯瓦螨生存曲线的影响

Fig.3 Cumulative survival of Apis mellifera and Varroa destructor after the main volatiles of celery seed treated

3 讨论与结论

如何除螨,是一个全球性的难题目前,化学药物仍是除螨的主要方式。部分化学药剂在短期内达到了出色的效果,但是病原体也逐渐对其产生了耐药性,例如部分主流杀螨剂包括氟胺氰菊酯(Fluvalinate)、氟氯苯氰菊酯(Flumethrin)、蝇毒磷(Coumaphos)、双甲脒(Amitraz)已经失去原先的抑螨水平。从长远来看,对环境友好的控制瓦螨方案可以从3个方面进行:(1)选育有抗瓦螨性能的新蜂种。例如法国、俄罗斯和美国都选育出清理行为极强的蜂种;瑞典和丹麦选育的蜂种可以用打开封盖的方式干扰瓦螨繁殖[21-23]。(2)用于蜜蜂共生菌抑制抑制瓦螨。美国Moran试验室研发出的共生菌可释放大量dsRNA,干扰瓦螨基因表达,以清除瓦螨[24]。(3)运用天然植物成分杀螨。早在十几年前,从植物中提取出来的丁香油(Clove oil)及茴香(Trans-anethole)就被发现不仅对蜜蜂无毒或低毒,且具有较强的杀螨作用[25]。本研究表明,芹菜籽和芹菜主成分使用熏杀的方法时均可有效杀螨。养蜂业需要安全又有效的杀螨剂,从植物中提取精油的方法越来越被大家关注。因其性质更天然温和,虽然见效一般不如化学药剂快,但是循序渐进、可持续地发挥药效。虽然高剂量的精油会导致蜜蜂中毒现象发生,但低影响最大剂量的精油对蜜蜂的毒性仍然远低于其他合成杀螨剂,如丁香油(Clove)、茴香烯(Turestar anisetree)、紫檀(Odoriferous

rosewood)类提取物作为杀螨剂的运用具有很大前景。在试验过程中,发现芹菜籽的成分处理不仅会提高瓦螨的掉落率,还会降低蜜蜂体内残翅病毒的含量,证明芹菜籽主成分或许能够在今后的残翅病病毒抑制中发挥作用。对于人类来说,植物防治最大的优点是植物提取物普遍对哺乳动物健康的威胁性更小,其次是残留量也较低,在使用后会慢慢挥发失活或消散^[26-29]。以植物提取液为主要成分的绿色杀螨剂,具备逐步取代化学杀螨剂的潜力。化学药物主要通过阻断瓦螨信号传递和离子通道,虽然分析了瓦螨排泄物,但是对代谢组的影响尚不清楚^[30]。在饲养杯中,发现芹菜籽具有较好的抑制瓦螨的作用。从单一成分分析来看,是挥发性物质起到关键作用,从代谢组结果来看,并没有明显的规律,因此尚且无法判断导致瓦螨死亡的主要通路。另外,芹菜籽在蜂群中的杀螨效果仍需要通过田间试验进行验证。

参考文献 Reference:

- [1] OLLENRTON F, WINFREE R, TARRANT S. How many flowering plants are pollinated by animals? [J]. Oikos, 2011, 120: 321-326.
- [2] 曾志将.养蜂学[M].4版.北京:中国农业出版社,2023. ZENG Z J.Apiculture [M].4rd ed. Beijing: China Agriculture Press,2023.
- [3] COX-FOSTER D L, COLAN S, HOLMES E, et al. A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder [J]. Science, 2007, 318:283-287.
- [4] RAMSEY S.D., OCHOAR, BAUCHANG, et al. Varroa destructor feeds primarily on honey bee fat body tissue and not hemolymph[J]. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America, 2019, 116(5): 1792-1801.
- [5] ROSENKRANZ P, AUMEIER P, ZIEGELMANN B.Biology and control of *Varroa destructor*[J]. Journal of invertebrate pathology, 2009, 103:96-119.
- [6] TRAYNOR K S, MONDET F, DE MIRANDA J R, et al. *Varroa destructor*: a complex parasite, crippling honey bees world-wide[J]. Trends in parasitology, 2020, 36(7):592-606.
- [7] ANDERSON D, EAST I J.The latest buzz about colony collapse disorder [J]. Science, 2008, 319(5864):724-725.
- [8] EVANS J D, COOK S C.Genetics and physiology of Varroa mites [J]. Current opinion in insect science, 2018, 26:130-135.
- [9] BOI M, SERRA G, COLOMBO R, et al. A 10 year survey of acaricide residues in beeswax analysed in Italy [J]. Pest management science, 2016, 72(7): 1366-1372.
- [10] ERBAN T, HARANT K, CHALUPNIKOVA J, et al. Beyond the survival and death of the deltamethrin-threatened pollen beetle *Meligethes aeneus*: an in-depth proteomic study employing a transcriptome database [J]. Journal of proteomics, 2017 (150):281-289.
- [11] ZHAN Y, FAN S, ZHANG M, et al. Modelling the effect of pyrethroid use intensity on mite population density for walnuts [J]. Pest management science, 2015, 71(1):159-164.
- [12] GONZÁLEZ-CABRERA J, RODRÍGUEZ-VARGAS S, DAVIES T G E, et al. Novel mutations in the voltage-gated Sodium channel of pyrethroid-resistant *Varroa destructor* populations from the southeastern USA[J]. Plos one, 11(5):e0155332.
- [13] LEZA M, LLADO G, MIRANDA M A. Comparison of the efficacy of Apiguard (thymol) and Apivar (amitraz) in the control of *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) [J]. Spanish journal of agricultural research, 2015, 13:e05SC01.
- [14] LIN Z G, SU X L, WANG S A, et al. Fumigant toxicity of eleven Chinese herbal essential oils against an ectoparasitic mite (*Varroa destructor*) of the honey bee(*Apis mellifera*)[J]. Journal of apicultural research, 2020, 59(2):204-210.
- [15] 颜伟玉,焦永亮,黄康,等.芹菜提取物防治大蜂螨试验[J].江西农业大学学报,2006,28(6):912-914.
 YAN W Y,JIAO Y L,HUANG K, et al.Studies on the effect of celery extracts on *Varroa jacobsoni*[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2006,28(6):912-914.
- [16] POWANDA M C, WHITEHOUSE M W, RAINSFORD K D.Celery seed and related extracts with antiarthritic, antiulcer, and antimicrobial activities [J]. Progress in drug research, 2015, 70:133-153.
- [17] 包洁, 张喜召, 窦晓兵, 等. 基于 AMPK 能量调节功能探讨中医实热"上火"的发病机制[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33 (9):4171-4176.

- BAO J, ZHANG X Z, DOU X B, et al. Discussion on pathogenesis of excessive heat 'shanghuo' based on the energy regulating function of AMPK[J]. China journal of traditional Chinese medicine and pharmacy, 2018, 33(9):4171-4176.
- [18] DUNN W B, BROADHURST D, BEGLEY P, et al. Procedures for large-scale metabolic profiling of serum and plasma using gas chromatography and liquid chromatography coupled to mass spectrometry [J]. Nature protocols erecipes for researchers, 2011,6(7):1060-1083.
- [19] WANT E J, WILSON I D, GIKA H, et al. Global metabolic profiling procedures for urine using UPLC-MS[J]. Nature protocols.2010;5(6):1005-1018.
- [20] BOULESTEIX A L, STRIMMER K.Partial least squares; a versatile tool for the analysis of high-dimensional genomic data [J].Briefings in bioinformatics, 2007;8(1):32-44.
- [21] THADURI S, STEPHAN J G, DE MIRANDA J R, et al. Disentangling host-parasite-pathogen interactions in a varroa-resistant honeybee population reveals virus tolerance as an independent, naturally adapted survival mechanism [J]. Scientific reports, 2019, 9(1):6221.
- [22] BEHRENS D, HUANG Q, GEBNER C, et al. Three QTL in the honey bee *Apis mellifera* L. suppress reproduction of the parasitic mite *Varroa destructor* [J]. Ecology and evolution, 2011, 1(4):451-458.
- [23] GRINDROD I, MARTIN S J.Parallel evolution of *Varroa* resistance in honey bees; a common mechanism across continents? [J].Proceedings of the royal society B, 2021, 288(1956); 20211375.
- [24] LEONARD S P, POWELL J E, PERUTKA J, et al. Engineered symbionts activate honey bee immunity and limit pathogens [J]. Science, 2020, 367(6477); 573-576.
- [25] 苏晓玲, 郑火青, 费中华, 等. 中草药精油对蜜蜂狄斯瓦螨的熏杀效果[J]. 应用昆虫学报, 2012, 49(5): 1189-1195. SUXL, ZHENGHQ, FEIZH, et al. Effectiveness of herbal essential oils as fumigants to control *Varroa destructor* in laboratory assays[J]. Chinese journal of applied entomology, 2012, 49(5): 1189-1195.
- [26] LI L, LIN Z G, WANG S, et al. The effects of clove oil on the enzyme activity of *Varroa destructor* Anderson and Trueman (Arachnida: Acari: Varroidae) [J]. Saudi journal of biological sciences, 2017, 24(5): 996-1000.
- [27] SASBAHI Q, HAMIDUZZAMAN M M, BARAJAS P J S, et al. Toxicity of anethole and the essential oils of lemongrass and sweet marigold to the parasitic mite *Varroa destructor* and their selectivity for honey bee (*Apis mellifera*) workers and larvae [J]. Psyche, 2018, 2018; 6196289.
- [28] LIN Z G, SU X L, WANG S A, et al. Fumigant toxicity of eleven Chinese herbal essential oils against an ectoparasitic mite (*Varroa destructor*) of the honey bee(*Apis mellifera*)[J]. Journal of apicultural reseach, 2020, 59(2):204-210.
- [28] 张丽,陈尚钘,范国荣,等.山苍子精油的化学成分和功能活性及其应用研究进展[J].江西农业大学学报,2021,43 (2):355-363.
 - ZHANG L, CHEN S X, FAN G R, et al. Research progress in application and functions of *Litsea cubeba* essential oil components [J]. Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis, 2021, 43(2):355-363.
- [30] POSADA-FLOREZ F, SONENSHINE D E, NOBLE N I, et al. Insights into the metabolism and behaviour of *Varroa destructor* mites from analysis of their waste excretions [J]. Parasitology, 2018, 146(4):527-532.